

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-213299

(43) 公開日 平成7年(1995)8月15日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	9453-4B		
// C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-11052

(22) 出願日 平成6年(1994)2月2日

(71) 出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
東京都文京区本郷二丁目35番10号

(72) 発明者 山本 敏

岩手県釜石市平田第3地割75-1

(72) 発明者 原山 重明

岩手県釜石市平田第3地割75-1

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 DNAジャイレース遺伝子による細菌の同定・検出法

(57) 【要約】

【構成】 細菌のDNAジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定を行うことを特徴とする、細菌の同定・検出法。

【効果】 従来より正確に細菌の種や株の定義を行うことが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細菌のDNAジャイレース(gyrase)遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定を行うことを特徴とする、細菌の同定法。

【請求項2】 塩基配列が、少なくともDNAジャイレース(gyrase)Bサブユニット上のHis-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列とMet-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレースBサブユニットの部分塩基配列であることを特徴とする、請求項1記載の細菌の同定法。

【請求項3】 細菌のDNAジャイレース(gyrase)遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の検出を行うことを特徴とする、細菌の検出法。

【請求項4】 塩基配列が、少なくともDNAジャイレース(gyrase)Bサブユニット上のHis-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列とMet-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレースBサブユニットの部分塩基配列であることを特徴とする、請求項3記載の細菌の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医学・各種産業（食品・化学等）領域及び環境保全（水処理・汚染物質の生物分解）において重要な役割を担う細菌を、遺伝子レベルで同定・検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、細菌の同定には、糖の資化性等の生化学検査が用いられてきた。しかし、これらを用いた検査はその検査項目が非常に多く煩雑で時間がかかり、にもかかわらず正確な結果を得ることが困難であった。近年では16SrRNAの塩基配列を用いた微生物種の遺伝子レベルの解析が行われている。しかし、16SrRNAは分子進化速度が遅く、近縁の菌種間ではその差異は微々たるものである。このため、16SrRNAシーケンスを用いた同定システムでは細菌の種や株の判定は困難であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】細菌を高い精度で分類・同定またはモニターするには遺伝子レベルでの比較・検出を行うことが望ましいが、このためには遺伝子のシーケンス情報を、任意の細菌について容易に入手することが必要不可欠となる。前述のrRNA遺伝子は種間を通して保存性の高いDNA塩基配列を有し、この配列をいわゆるユニバーサルプライマーとして用いることによって、ほとんどの細菌種において比較的容易にPCR増幅を行うことができ、また、その増幅断片からシーケンスを行うことができる。しかし、他の構造遺伝子ではこのような種間を通して保存されたDNA塩基配列

は存在しないため、これまでは同様の方法でシーケンス情報を入手することはできなかった。このため従来はシーケンスを行うために1種ごとにクローニング操作を行わなくてはならず、分類・同定といった目的にこれらの遺伝子を応用することは事実上不可能だった。

【0004】本発明の目的は、任意の細菌から遺伝子のシーケンス情報を容易に入手する方法を確立し、簡便でかつ精度の高い細菌の同定・検出方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、細菌に普遍的に存在するDNAジャイレース蛋白上に種間を通して保存性の高いアミノ酸配列が存在することを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。即ち、本発明の第一は、細菌のDNAジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定を行うことを特徴とする、細菌の同定法である。ここで塩基配列としては、DNAジャイレースBサブユニット上のHis-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列とMet-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレースBサブユニットの部分塩基配列を用いることができる。

【0006】また、本発明の第二は、細菌のDNAジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の検出を行うことを特徴とする、細菌の検出法である。ここで塩基配列としては、DNAジャイレースBサブユニット上のHis-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列とMet-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレースBサブユニットの部分塩基配列を用いることができる。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、細菌のDNAジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定・検出を行うものである。具体的には、DNAジャイレース遺伝子上の特定の塩基配列を含むDNA断片をPCR法により増幅し、ついでジデオキシ法等によりDNA断片の塩基配列を決定し、この塩基配列に基づき細菌の同定・検出を行うものである。

【0008】PCR法に用いるプライマーとしては、His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むセンスプライマーとMet-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むアンチセンスプライマーの2種類のプライマーを用いる。それぞれのプライマーの鋳型DNA結合部位はE.coli K12株ジャイレースBサブユニットアミノ酸配列(GYRB ECOLI[SWISS-PROT])のpos.97-104, pos.495-501に相当する。これらのプライマーを用いることにより、DNAジャイレースBサブユニット上のHis-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸

配列とMet-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Glyで表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレースBサブユニットの部分塩基配列を含むDNA断片を増幅することができる。また、上記センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、図1及び図2に示すように7および8アミノ酸配列にもとづいて設計されている。図が示すようにセンスプライマーではC末端側のアスパラギン酸に対応するコドンの3番目の塩基を削除し、またアンチセンスプライマーではN末端側のグリシンに対応するコドンの3番目の塩基を固定することにより、それぞれのプライマーを512種類の混合としている。

【0009】このようなミックスプライマーによる増幅断片は、その塩基配列全体が未知でプライマー配列が得られないため直接シーケンスを行うことができない。そこで本発明では図3に示したようにあらかじめプライマー5'末端に既知の配列を付加しておき、この塩基配列をシーケンスプライマーとして用いることによって増幅断片より直接塩基配列を求める。なお、本法によりシーケンスできるのは各プライマーより350bp程度である。

【0010】増幅されたDNA断片の塩基配列は、ジデオキシ法等の公知の塩基配列決定法により求めることができる。この塩基配列は、実施例に示すように、同属種間あるいは株間で異なっており、その相違度は、同一種間で比較を行った場合、16SrRNAの塩基配列に比べ顕著に高く、このため、16SrRNAのように複数のプライマーを用いて長い塩基配列を決定する必要がない。このような塩基配列の特異性を利用し、得られたDNAジャイレース遺伝子塩基配列情報をいわゆるsignature塩基配列として用いることができ、これにより複雑な生化学検査を行うことなしに簡便かつ高精度に菌の同定を行うことができる。また、求めた塩基配列をそのままプローブに利用することもでき、さらには近縁菌種の塩基配列を同様に求めて多重比較を行うことにより、種あるいは株レベルでの非常に高い特異性を有するプローブの作成が可能である。これらのプローブにより、未知の菌を多数含む天然菌叢中でも目的とする菌を特異的に検出できる。また、容易に菌を遺伝子レベルで表現できるため、未同定の新種の記述を行うことが可能である。

【0011】本発明により同定・検出できる細菌は、グラム陰性菌の大部分とグラム陽性菌の一部である。具体的な属を例示すると、エッシャーシア属、シュードモナス属、アシネトバクター属、サルモネラ属、バチルス属等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0012】

【実施例】

実施例：グラム陰性菌同定への応用

図3に示したプライマーを用いて、エッシャーシア属1株(*E. coli* K12)、シュードモナス属4株(*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alkanoxytica*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター属14株(*A. calcoaceticus* CIP81.08, *A. baumannii* CIP70.34, *Acinetobacter* sp.3 CIP70.29, *A. haemolyticus* CIP64.3, *A. junii* CIP64.5, *Acinetobacter* sp.6 CIPA165, *A. johnsonii* CIP64.6, *A. lwoffii* CIP64.10, *Acinetobacter* sp.9 CIP70.31, *Acinetobacter* sp.10 CIP70.12, *Acinetobacter* sp.11 CIP63.46, *Acinetobacter* sp.12 SEIP12.81 : CIP及びSEIPはパスツール研究所の保存番号である)と未同定の新規炭化水素分解菌T4株及びSM-8 4L株のDNAジャイレース遺伝子のPCR増幅を試みた。

【0013】この結果すべての株でほぼ単一の増幅産物を得ることができた。この増幅産物より図3に示したシーケンスプライマーを用いて、ジデオキシ法により塩基配列を求めた。*E. coli* K12, *Pseudomonas putida*のアミノ酸配列データはデータベースに登録されたデータと一致した。次に、上記と同様の方法でT4株の塩基配列と*Acinetobacter*属3株の塩基配列を求め、両者の塩基配列を比較した。この結果を図4に示す。図に示すようにT4株は*Acinetobacter*属に属し、ATCC31012株に最も近い新種であることが確認された。また、*Acinetobacter*属内でもDNAジャイレース遺伝子の塩基配列は異なっており、*Acinetobacter calcoaceticus*の種内でも株により違いが認められた。即ち、DNAジャイレース遺伝子の塩基配列を比較することにより菌株を判別することができた。また、得られた塩基配列よりT4株に特異的なPCRプライマーを作出し、増幅の有無によってATCC31012株と判別することが可能であった。

【0014】

【発明の効果】本発明により、従来より正確に細菌の種や株の定義を行うことが可能となる。これは、例えば、感染症の診断などに利用することができ、また、複雑な菌叢から特定の細菌の消長を追うことが可能となり、微生物環境浄化システムの開発、食品製造工程の管理等にも利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に用いるセンスプライマーを示す。

【図2】 本発明に用いるアンチセンスプライマーを示す。

【図3】 本発明に用いるシーケンスプライマーの一例を示す。

【図4】 T4株、及び公知のアシネトバクター属菌株の塩基配列を示す。

【図1】

センスプライマー

<u>Glu-Val-Ile-Met-Thr-Val-Leu-His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp</u>													
GAA	GTT	ATT	ATG	ACT	GTT	TTA	CAT	GCT	GGT	GGT	AAA	TTT	GAT
GAG	GTC	ATC		ACC	GTC	TTG	CAC	GCC	GGC	GGC	AAG	TTC	GAC
STA	ATA			ACA	GTA	CYT	GCA	GGA	GGA	削除して使用せず			
GTG				ACG	GTG	CTC	GCG	GGG	GGG				
							CTA	プライマー部					
							CTG						

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。

【図2】

アンチセンスプライマー

Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly-Ser-His-Ile-Arg-Thr-Leu									
ATG	ACT	GAT	GCT	GAT	GTT	GAT	GGT	TCT	CAT
ACC	GAC	GCC	GAC	GTC	GAC	GGC	TCC	CAC	ATC
ACA	GCA	GTA	GGG	TCA	ATA	CGA	ACA	CTT	
ACG	GCG	GTG	GGG	TGG	CGG	ACG	CTC		
			プライマー部		固定AGT	AGA	CTA		
					AGC	AGG	CTG		

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。

【図3】

センスプライマー

>PCRプライマー

Gp-1: 5'-gaagtcacatcatgacogtctctgca(tc)gc(agtc)gg(agtc)gg(agtc)aa
 (ag)tt(tc)ga-3' = 41mer ():Mix

一部共有

>シーケンスプライマー

Gp-s1: 5'-gaagtcacatcatgacogtctctgca-3' = 23mer

アンチセンスプライマー

>PCRプライマー

Gp-R2: 5'-agcaggggtacggatgtgagagcc(ag)tc(agtc)ac(ag)tc(agtc)gc
 (ag)tc(agtc)gtcat-3' = 44mer ():Mix

一部共有

>シーケンスプライマー

Gp-sR2: 5'-agcaggggtacggatgtgagagcc-3' = 23mer

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。

【図4】

gyrB核酸塩基配列の種内変異の一例

本発明を用いて決定されたgyrB核酸塩基配列の*Acinetobacter calcoaceticus* 3株および新規炭化水素分解菌*Acinetobacter* sp. T4における相違を示す。本結果よりT4特異PCRプライマーを作成した。

```

CIP81.08  1:ACAGTTATAAGGTTTCAGGTGGTTTACACCGCGTAGGTGTTTCTGTAGTAAACGCACMTT
ATCC31012 1:....C....A..A..G.....G.G.....T....T..G..C.
ATCC33308 1:..T..CC.....T..C...C.G..TG..T.....G..A..G..C..T..CT..G.
T4        1:CT..C....A..A..G.....TA..G.....T....T..G..C.
          **  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08  61:CGAGTAAATTACATTTAATGATTTCCTGCTGGTCAAGTGCATGAGCAAGAATATCAAC
ATCC31012 61:..T.AA.....G.....G.C....CA.....G...A.C.....CGCG.
ATCC33308 61:..C..C..GC....G....CC...CA.....GA..C....A..G.....G.
T4        61:..T.AA.....G.....G.C....CA.....G...A.C.....CGCG.
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08  121:ACGGCGATCCGCAATATCCATTACGTGTGATTGGTGAACGGATAAGAGTGGTACAACGG
ATCC31012 121:..T..T....A.....T....AAA..TG..G.....T....CATCG..A....C.
ATCC33308 121:.....T....G.....GC...AAA..G..C.....ATC..CC..CG....T..T.
T4        121:..T..T....A.....T....AAA..TG..G.....T....CATCG..A....C.
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08  181:TACGCTTTTGGCCCAAGTGAATTAACATTTTACTCAAAACCATTTTAAACGTAGAAATTTCTAG
ATCC31012 181:..T..T..C.....G.....G..C....GC.....G....C.GT..T..T..CT..G.
ATCC33308 181:....T..C.....GGGAT..T....GC..G..T.....T..T..T....G.
T4        181:..T..T..C.....G.....GG..C....GC.....G....C.GT..T..T..CT..G.
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08  241:CACGCGGTTTACGTGAGCTTTCATTCTTAAACGCGGGCGTACGTATTGTTTACGCGATG
ATCC31012 241:..T..T....A..A..A....T....G..T..T..T.....C..AC..G..T....
ATCC33308 241:.....G..T..TC...T..A....TAAA..A..CC..G..T....
T4        241:..T..T....A..A..A....T....G..T..T..T.....C..AC..G..T....
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08  301:AACGTATTAACTTGGACATGTTTTTGACTACGAAGGTGGGTTATCTGAGT
ATCC31012 301:....CG..G....C..A....A..C..A...T..T..G..TG..C.....
ATCC33308 301:....G..G...T...AG...A...A..C...T....C..CC..G..A....
T4        301:....CG..G....C..A....A..C..A...T..T..G..TG..T.....
          ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

*は全ての株で一致した塩基を示す。CIP81.08T以外の株は、CIP81.08Tと異なった塩基のみを示した。CIP81.08T(ATCC23055T)は*Acinetobacter calcoaceticus*のtype strain

CIP, Collection de l'Institut Pasteur

ATCC, American Type Culture Collection